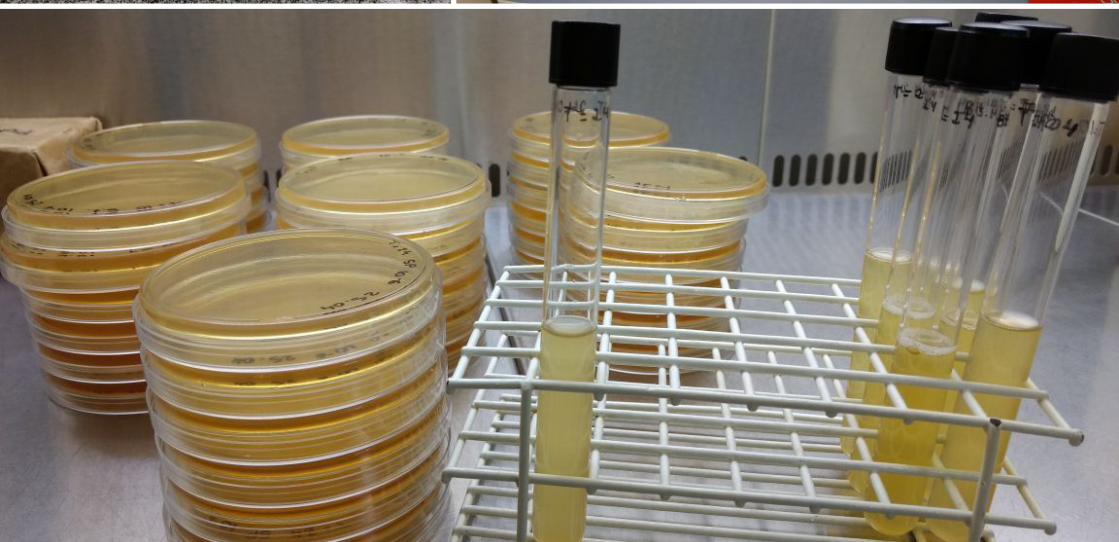


Caracterização Tecnológica de Bactérias Lácticas Visando à sua Aplicação na Produção de Fermentos Lácticos



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agroindústria Tropical
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 175

Caracterização Tecnológica de Bactérias Lácticas Visando à sua Aplicação na Produção de Fermentos Lácticos

*Laura Maria Bruno
Terezinha Feitosa Machado*

Embrapa Agroindústria Tropical
Fortaleza, CE
2017

Unidade responsável pelo conteúdo e edição:

Embrapa Agroindústria Tropical
Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici
CEP 60511-110 Fortaleza, CE
Fone: (85) 3391-7100
Fax: (85) 3391-7109
www.embrapa.br/agroindustria-tropical
www.embrapa.br/fale-conosco

Comitê de Publicações da Embrapa Agroindústria Tropical

Presidente: *Gustavo Adolfo Saavedra Pinto*

Secretária-executiva: *Celli Rodrigues Muniz*

Secretária-administrativa: *Eveline de Castro Menezes*

Membros: *Janice Ribeiro Lima, Marlos Alves Bezerra, Luiz Augusto Lopes Serrano,
Marlon Vagner Valentim Martins, Guilherme Julião Zocolo, Rita de Cássia
Costa Cid, Eliana Sousa Ximendes*

Supervisão editorial: *Ana Elisa Galvão Sidrim*

Revisão de texto: *Marcos Antônio Nakayama*

Normalização: *Rita de Cássia Costa Cid*

Editoração eletrônica: *Arilo Nobre de Oliveira*

Fotos da capa: *Laura Maria Bruno*

1ª edição

On-line (2017)

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Agroindústria Tropical

Bruno, Laura Maria.

Caracterização tecnológica de bactérias lácticas visando à sua aplicação na produção de fermentos lácticos / Laura Maria Bruno, Terezinha Feitosa Machado. – Fortaleza : Embrapa Agroindústria Tropical, 2017.

18 p. ; 14,8 cm x 21 cm. – (Documentos / Embrapa Agroindústria Tropical, ISSN 2179-8184; 175).

Publicação disponibilizada on-line no formato PDF.

1. Crescimento em leite. 2. Atividade proteolítica. 3. Aminas biogênicas. 4. Bactérias patogênicas. 5. Resistência a fagos. 6. Bactérias lácticas. I. Machado, Terezinha Feitosa. II. Título. III. Série.

CDD 579.36

© Embrapa 2017

Autores

Laura Maria Bruno

Engenheira de alimentos, doutora em Ciências
Biológicas, pesquisadora da Embrapa Agroindústria
Tropical, Fortaleza, CE, laura.bruno@embrapa.br

Terezinha Feitosa Machado

Engenheira de alimentos, doutora em Bioquímica,
pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical,
Fortaleza, CE, terezinha.feitosa@embrapa.br

Apresentação

Bactérias lácticas são microrganismos associados à elaboração de diversos tipos de alimentos, destacando-se sua grande importância na produção de derivados de leite.

Apesar da disponibilidade de diversos fermentos lácticos comerciais, é constatado que, quando se deseja reproduzir um produto artesanal atendendo às normas legais, muitas vezes o uso desses fermentos lácticos comerciais altera as características originais do alimento artesanal.

Assim, busca-se isolar de produtos artesanais microrganismos mais adequados à fabricação desses produtos e que contribuam para a manutenção das características sensoriais, além de garantirem a qualidade do alimento e a segurança microbiológica dos consumidores.

Com esse objetivo, o presente documento apresenta um resumo e discussão de técnicas úteis empregadas na caracterização tecnológica de bactérias lácticas, fundamentais para a seleção de microrganismos que possam ser utilizados na elaboração de fermentos lácticos para produção de alimentos.

Lucas Antonio de Sousa Leite
Chefe-Geral da Embrapa Agroindústria Tropical

Sumário

Introdução.....	7
Crescimento em leite	8
Atividade proteolítica	9
Produção de aminas biogênicas.....	10
Inibição de bactérias patogênicas	11
Resistência a fagos.....	12
Interação entre bactérias láticas	13
Conservação de bactérias láticas.....	13
Avaliação da viabilidade de bactérias láticas	14
Características desejáveis de bactérias láticas para a indústria de alimentos	14
Referências	16

Caracterização Tecnológica de Bactérias Lácticas Visando à sua Aplicação na Produção de Fermentos Lácticos

Laura Maria Bruno

Terezinha Feitosa Machado

Introdução

Bactérias ácido-láticas (BAL) são microrganismos Gram positivos que não produzem esporos, são catalase-negativos, resistentes a ácido, com pH ótimo de crescimento entre 4,0 e 4,5 e temperaturas ótimas de crescimento de 30 °C e 42 °C para espécies mesófilas e termófilas, respectivamente, podendo apresentar-se na forma de cocos ou bacilos (SABO et al., 2014).

Esses microrganismos são frequentemente utilizados na fermentação de alimentos. Contribuem para extensão da vida útil do alimento, pela diminuição do pH, ou ainda, pela produção, por algumas espécies, de peptídeos antagonistas contra outras bactérias. Devido ao acúmulo de ácido, as BAL também modificam as propriedades reológicas e organolépticas dos produtos (MADERA et al., 2003).

Outra característica das BAL é interferir na intensidade do sabor e aroma dos alimentos fermentados. Em queijos, por exemplo, esse efeito está ligado a atividades metabólicas como a proteólise secundária, o metabolismo dos carboidratos remanescentes e a capacidade de produzir aminoácidos livres e metabolizá-los, levando à formação de compostos flavorizantes (BURNS et al., 2012; GUARCELLO et al., 2016).

A busca por novas espécies de BAL com características tecnológicas de interesse para a indústria de alimentos é constante, tanto para a produção como para a inovação de produtos fermentados. É constituída de várias etapas que incluem a coleta, o isolamento, a identificação morfológica e bioquímica, a caracterização e a preservação dos microrganismos responsáveis pelas características desejadas do produto fermentado (BRUNO, 2011). A caracterização tecnológica consiste em avaliar atividades metabólicas relacionadas ao crescimento e sobrevivência em matrizes alimentícias, a capacidade acidificante, proteolítica, viabilidade, resistência a bacteriófagos, produção de aminas biogênicas entre outras, que serão discutidas a seguir.

Crescimento em leite

Uma das mais importantes características tecnológicas na avaliação de BAL, sobretudo se serão utilizadas em alimentos derivados de leite, é verificar se crescem e sobrevivem em meios à base de leite (VINDEROLA et al., 2008).

A cultura do microrganismo deve ser cultivada em caldo Man, Rogosa e Sharp (MRS) a 37 °C por 16 horas, centrifugada (6.000 g, 15 min, 4 °C) e lavada duas vezes em solução tampão fosfato-salina (1 M, pH 7,4). As células devem ser ressuspensas ao mesmo volume do cultivo inicial em meio leite desnatado reconstituído (LDR) a 10% (por exemplo, se foram cultivadas em 5 mL de MRS, devem ser ressuspensas em 5 mL de LDR). Em seguida, uma alíquota da suspensão (25% v/v) é inoculada em tubos contendo 10 mL de LDR e incubada a 37 °C em anaerobiose. As mudanças no pH do leite devem ser acompanhadas nos tempos 0, 6, 12, 24 e 48 horas de incubação (VINDEROLA et al., 2008). Assim, é possível verificar se a bactéria é um acidificante rápido (acidifica o leite em até 16 horas) ou lento (necessita de mais do que 36 horas para acidificar o leite), bem como determinar a cinética de acidificação em leite pelo acompanhamento da diminuição do pH ao longo do tempo (BRIGGILER-MARCÓ et al., 2007; GEORGIEVA et al., 2009).

Variações desse teste são descritas por Briggiler-Marcó et al. (2007) e Georgieva et al. (2009). A primeira variação se refere ao tamanho do inóculo que será utilizado. Ambos os grupos recomendam que uma alíquota de 2% (v/v) da suspensão seja inoculada em LDR 10%. Também é recomendado que, além de realizar o ensaio em LDR, sejam utilizados também LDR suplementado com glucose, LDR suplementado com caseína hidrolisada e ainda LDR suplementado com glucose e caseína hidrolisada. Também é possível usar extrato de levedura no lugar da caseína hidrolisada. Essa avaliação permite determinar se o microrganismo consegue se desenvolver apenas em leite ou se necessita de fonte de carbono e/ou de nitrogênio adicionais.

A determinação dessas características indica se o microrganismo será utilizado como cultura iniciadora ou “starter” (cepas de acidificação rápida) ou como culturas adjuntas (cepas de acidificação lenta).

Atividade proteolítica

A atividade proteolítica das BAL exerce influência nas características sensoriais do produto como sabor, aroma e textura do alimento (NIETO-ARRIBAS et al., 2009) e é mensurada por ensaios espectrofotométricos, como o método *o*-phtaldeído (OPA) (CHURCH et al., 1983). Após o crescimento da bactéria em leite, como descrito no tópico anterior, uma alíquota de 5 mL da suspensão bacteriana é transferida para um tubo de 20 mL, adicionada de água destilada estéril (1 mL) e de ácido tricloroacético 0,75 N (10 mL). A mistura é agitada em vórtex, mantida em repouso por 10 minutos e filtrada em papel de filtro Whatmann 40. Para realização do OPA, adiciona-se, numa cubeta de quartzo, 2 mL de solução de OPA (CHURCH et al., 1983) e 100 μ L de filtrado. Após repouso de 2 minutos, realiza-se a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 340 nm. Recomenda-se fazer uma testemunha com o meio LDR sem cultivo e outra com água destilada.

Outros protocolos, como o método de Hull (1947) e de Citti et al. (1963), também são empregados. As bactérias são cultivadas em LDR 10% e também há um tratamento da amostra com ácido

tricloroacético. Depois da etapa de filtração, uma alíquota do filtrado é adicionada a uma solução de carbonato de sódio 15% e pirofosfato de sódio 2%, aquecida a 40 °C, acrescentando-se o reagente fenol Folin-Ciocalteu. A densidade ótica é lida em espectrofotômetro a 650 nm, e a atividade proteolítica é expressa em micrograma de tirosina por mililitro de amostra, após a comparação com os valores de uma curva de calibração de tirosina.

Cepas com baixa atividade proteolítica são empregadas como culturas adjuntas em diferentes tipos de queijos. Elas contribuem para o aumento da quantidade de pequenos peptídeos e aminoácidos livres, principais precursores dos compostos específicos responsáveis pelo aroma e sabor dos alimentos.

Produção de aminas biogênicas

A produção de aminas biogênicas é uma característica indesejável para bactérias usadas na fermentação, devido aos problemas toxicológicos provocados pela ingestão de alimentos que contenham alto nível dessas substâncias. Assim, para serem consideradas seguras, as bactérias lácticas não devem produzi-las.

A metodologia descrita por Bover-Cid e Holzapfel (1999) avalia o potencial de produção das aminas biogênicas tiramina, histamina, putrescina e cadaverina pela adição de 1% (p/v) de cada um de seus aminoácidos precursores (sal de tirosina dissódica, monohidrocloreto de L-histidina, monohidrocloreto de L-ornitina e L-lisina) ao ágar MRS contendo púrpura de bromocresol a 0,06%. O aparecimento de cor púrpura sobre as placas ou o desaparecimento do precipitado de tirosina em torno das colônias é considerado como reação positiva.

Como a produção de aminas biogênicas em alimentos ocorre principalmente devido à descarboxilação do aminoácido correspondente pela sua enzima específica, também é possível analisar a presença de genes que codificam aminoácido descarboxilases, tais como *hdc1* e *hdc2* (histidina descarboxilase), *odc* (ornitina descarboxilase) e *tdc* (tirosina descarboxilase) (SANTOS et al., 2015).

Bover-Cid e Holzapfel (1999) ainda alertam para o fato de que resultados negativos para produção de aminas biogênicas em meios sintéticos não implicam um comportamento similar no alimento, o qual é um sistema complexo com grande número de fatores que influenciam o crescimento microbiano e sua atividade metabólica.

Inibição de bactérias patogênicas

A capacidade de inibição de bactérias patogênicas por bactérias lácticas pode ser avaliada “in vitro” pelo ensaio de difusão em ágar (VINDEROLA et al., 2002a). A bactéria é cultivada a 37 °C por 16 horas. Após o crescimento, a suspensão é centrifugada (3.300 g, 20 min, 5 °C), e o sobrenadante livre de células (SLC) é recolhido, esterilizado por filtração em membranas (diâmetro de poro 0,45 µm) e mantido congelado (-20 °C) até o momento de uso. Os patógenos a serem avaliados também são ativados por 16 horas, e uma alíquota (200 µL) do cultivo é adicionada a 20 mL de ágar nutritivo (*Salmonella*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*) ou de ágar BHI (*Listeria monocytogenes*), fundido a temperatura de 45 °C, agitada em vórtex e vertida em placa de Petri. Após a solidificação do ágar, são feitos poços (10 mm de diâmetro), nos quais são inoculados 180 µL de cada SLC. As placas são incubadas em aerobiose a 37 °C durante 24 horas. A presença de um halo transparente ao redor do poço indica inibição do patógeno.

A inibição de bactérias patogênicas por bactérias lácticas é uma característica positiva porque está associada ao aumento da segurança do alimento. Porém, em caso de resultado positivo no ensaio de difusão em ágar, ou seja, formação de halo de inibição, é necessário investigar a natureza química das substâncias inibidoras de patógenos presentes nos SLC das bactérias lácticas. Guglielmotti et al. (2007) recomendam que o SLC seja submetido aos seguintes tratamentos: inativação térmica (121 °C, 15 min), neutralização com NaOH e tratamento (1 hora, 37 °C) com proteinase K e pepsina (200 µg/mL). Após os tratamentos, o SLC é esterilizado por filtração (membranas de

diâmetro de poro 0,45 μm) e congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização do ensaio de difusão em ágar como já descrito. Se a substância inibidora for de natureza proteica, o halo verificado no primeiro ensaio deverá desaparecer após os tratamentos térmico e enzimático e investigações posteriores poderão ser realizadas para identificar a substância inibidora. Se a inibição for ocasionada pelo caráter ácido do sobrenadante, o halo desaparecerá apenas após a neutralização do SLC.

Resistência a fagos

A resistência a fagos é uma característica determinante na seleção de novos microrganismos (BRUNO; LIMA, 2011). A susceptibilidade da bactéria a um fago diminui a sua viabilidade e geralmente interfere na sua capacidade de produção de ácido, tornando-a muito lenta ou completamente nula, o que conduz ao colapso do processo fermentativo e, conseqüentemente, a perdas econômicas. Portanto, essa característica representa um sério desafio na produção de produtos lácteos fermentados.

O teste de turbidez (SVENSSON; CHRISTIANSSON, 1991) é um dos testes empregados para analisar a sensibilidade das cepas de lactobacilos a fagos. Para realização do teste, é necessário utilizar fagos líticos e suas cepas sensíveis de referência, os quais podem ser adquiridos de coleções de cultura, e são empregados para controle do ensaio. Em relação aos fagos, outra possibilidade é proceder ao seu isolamento no ambiente de processamento (LIMA et al., 2012). As cepas sensíveis e as cepas de bactérias lácticas são cultivadas em caldo MRS a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 24 horas. Alíquotas de 200 μL de cada cepa e de 100 μL de cada fago são inoculadas em tubos contendo 5 mL de MRS-Ca (caldo MRS adicionado de 50 μL de CaCl_2 1 M). O crescimento de cada cepa em cada condição é observado por aproximadamente 6 horas, por três repiques consecutivos. Uma cepa é considerada sensível se houver lise celular ao menos no terceiro repique. Se não ocorrer lise em nenhum dos três repiques, considera-se a cepa resistente ao fago em análise.

Interação entre bactérias lácticas

O ensaio de difusão em ágar com SLC de lactobacilos (VINDEROLA et al., 2002a) também é utilizado para investigar a capacidade de cepas de determinada bactéria láctica inibirem o desenvolvimento de outras cepas do mesmo gênero e espécie, bem como de cepas de outros gêneros. Esse ensaio é importante quando se deseja adicionar uma cepa cuja função não é necessariamente promover a fermentação. Considere-se, por exemplo, o caso de uma cepa de *Lactobacillus* que será adicionada a um iogurte para atuar como cepa probiótica. No iogurte, a fermentação é conduzida por um cultivo láctico composto de *Lactobacillus* e *Streptococcus*. Nesse caso, é importante verificar se o *Lactobacillus* probiótico não interfere no desenvolvimento de nenhum dos microrganismos que compõem o fermento láctico e vice-versa, para garantir que a fermentação aconteça e que o *Lactobacillus* probiótico também se desenvolva no alimento.

O ensaio é realizado do mesmo modo que o já descrito para estudar a ocorrência de inibição de patógenos, utilizando o SLC da bactéria que está sendo estudada e inoculando, ao invés de patógenos, as bactérias que compõem a cultura láctica usada para a fabricação do produto.

Conservação de bactérias lácticas

Existem diversos métodos de preservação de microrganismos, tais como o congelamento a -20 °C e -80 °C e a secagem das células. Atualmente, a secagem tem adquirido um papel importante na produção comercial de culturas microbianas, pois oferece vantagens como a preservação dos microrganismos por um longo período, estabilidade celular e conveniência no transporte, armazenamento e dosagem das culturas (KATECHAKI et al., 2009). Dentre as técnicas baseadas em secagem, destaca-se o uso de liofilização para conservação das células de bactérias lácticas (AMPATZOGLOU et al., 2010; KATECHAKI et al., 2009; CHAMPAGNE et al., 1991).

De acordo com Otero et al. (2007), cepas de *Lactobacillus* podem ser liofilizadas em meios como LDR 6% (p/v), LDR 6% (p/v) e lactose 6% (p/v), LDR 6% (p/v) e sacarose 6% (p/v) e água destilada. As células são ativadas em caldo MRS a 37 °C por 14 horas, centrifugadas (6.000 g/10 min, 4 °C), lavadas duas vezes e ressuspensas em volume de água destilada 10% menor em relação ao volume usado para o cultivo em MRS. Essa suspensão é dividida em frações de 20 mL, as quais são centrifugadas e ressuspensas em 20 mL de cada um dos meios sugeridos anteriormente. Em seguida, alíquotas de 0,4 mL de cada suspensão são distribuídas em ampolas, congeladas (-70 °C/18 h) e liofilizadas sob vácuo (0,3 mbar/12 h). Após a liofilização, as ampolas são seladas e estocadas sob refrigeração.

É importante ressaltar que, mesmo que se deseje promover a liofilização de microrganismos de uma mesma espécie, é necessário adequar as condições do processo para cada bactéria que se pretenda preservar.

Avaliação da viabilidade de bactérias láticas

Para avaliar a viabilidade das BAL em relação ao método de conservação, realiza-se a contagem das células viáveis em ágar MRS no início do processo, ou seja, antes das células serem submetidas à secagem, imediatamente após o processo e durante a estocagem por um período de, por exemplo, 120 dias (LAVARI et al., 2015).

Características desejáveis de bactérias láticas para a indústria de alimentos

A escolha dos ensaios utilizados na caracterização tecnológica de BAL para uso em alimentos depende muito da função que o microrganismo exercerá no produto, bem como do próprio produto ao qual ele será adicionado. Assim, além dos ensaios já descritos, encontra-se na literatura uma série de outros protocolos que podem ou não ser realizados de acordo com a aplicação que será dada à bactéria.

Por exemplo, no caso de bactérias que serão usadas em bebidas lácteas fermentadas, é recomendável avaliar a influência da incorporação de aditivos (KCl, NaCl, sacarose, lactose, acesulfame, aspartame, corantes naturais, flavorizantes, nisina, etc.), sucos naturais de frutas e compostos aromáticos, como diacetil, acetaldeído e acetoina, no crescimento de bactérias lácticas (VINDEROLA et al., 2002b).

Georgieva et al. (2009) e Vinderola et al. (2008) sugerem que, em leites fermentados, também seja estudada a viabilidade das bactérias lácticas durante a estocagem em baixa temperatura, por meio do acompanhamento de mudanças no pH do produto, para garantir a presença de microrganismos vivos até o momento do seu consumo.

Nieto-Arribas et al. (2009) propõem a realização da investigação da atividade de peptidase em queijos maturados, devido ao papel que aminopeptidases desempenham na hidrólise de peptídeos amargos e na formação de flavor indesejável nesse produto.

A atividade lipolítica, sobretudo para queijos maturados, é outra característica que deve ser avaliada. É desejável que a atividade lipolítica seja baixa, pois as bactérias lácticas geralmente estão presentes em alto número, e a quebra da gordura do leite durante a maturação deve ser lenta com o objetivo de assegurar a produção de aroma, mas evitando a rancidez (GEORGIEVA et al., 2009; NIETO-ARRIBAS et al., 2009).

Outra característica que pode ser avaliada para bactérias lácticas que atuarão durante a maturação de queijos é a atividade autolítica, a qual está relacionada à liberação de enzimas intracelulares que influenciam nas propriedades de sabor, aroma e textura dos queijos (LAZZI et al., 2016; NIETO-ARRIBAS et al., 2009).

Os ensaios apresentados para caracterização tecnológica de BAL são relativamente simples e possíveis de ser realizados em laboratório de microbiologia, tendo sempre em vista a aplicação que será dada ao microrganismo.

Referências

AMPATZOGLU, A.; SCHURR, B.; DEEPIKA, G.; BAIPONG, S.; CHARALAMPOPOULOS, D. Influence of fermentation on the acid tolerance and freeze drying survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, p. 65-70, 2010.

BOVER-CID, S.; HOLZAPFEL, W. H. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 53, p. 33-41, 1999.

BRIGGILER-MARCÓ, M.; CAPRA, M. L.; QUIBERONI, A.; VINDEROLA, G.; REINHEIMER, J. A.; HYNES, E. Nonstarter *Lactobacillus* strains as adjunct cultures for cheese making: in vitro characterization and performance in two model cheeses. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 4532-4542, 2007.

BRUNO, L. M. Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: bactérias ácido lácticas. **Documentos 336**. Brasília, DF. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2011.

BRUNO, L. M.; LIMA, C. P. Bacteriófagos no ambiente de processamento do leite. **Documentos 137**. Fortaleza, CE. Embrapa Agroindústria Tropical. 2011.

BURNS, P.; CUFFIA, F.; MILESI, M.; VINDEROLA, G.; MEINARDI, C.; SABBAG, N.; HYNES, E. Technological and probiotic role of adjunct cultures of non-starter lactobacilli in soft cheeses. **Food Microbiology**, v. 30, p. 45-50, 2012.

CHAMPAGNE, C.P.; GARDNER, N.; BROCHU, E.; BEAULIEU, Y. The freeze-drying of lactic acid bacteria: a review. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v. 24, p. 118-128, 1991.

CITTI, J. E.; SANDINE, W. E.; ELLIKER, P. Some observations on the Hull method for measurement of proteolysis in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 46, p. 337-341, 1963.

CHURCH, F. C.; SWAISGOOD, H. E.; PORTER, D. H.; CATIGNANI, G. L.

Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 66, p. 1219-1227, 1983.

GEORGIEVA, R.; ILIEV I.; HAERTLÉ, H.; CHOBERT, J.M; IVANOVA, I.; DANOVA,

S. Technological properties of candidate probiotic *Lactobacillus plantarum* strains.

International Dairy Journal, v. 19, p. 696-702, 2009.

GUARCELLO, R.; CARPINO, S.; GAGLIO, R.; PINO, A.; RAPISARDA, T.; CAGGIA,

C.; MARINO, G.; RANDAZZO, C.L.; SETTANNI, L.; TODARO, M. A large factory-scale application of selected autochthonous lactic acid bacteria for PDO Pecorino Siciliano

cheese production. **Food Microbiology**, v. 59, p. 66-75, 2016.

GUGLIELMOTTI, D. M.; BRIGGILER-MARCÓ, M.; GOLOWCZYC, M.; REINHEIMER, J. A.;

QUIBERONI, A. L. Probiotic potential of *Lactobacillus delbrueckii* strains and their phage resistant mutants. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 916-925, 2007.

HULL, M. E. Studies on milk proteins. II. Colorimetric determination of the partial

hydrolysis of the proteins in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 30, p. 881-884, 1947.

KATECHAKI, E.; PANAS, P.; KOURKOUTAS, Y.; KOLIOPOULOS, D.; KOUTINAS, A.A.

Thermally-dried free and immobilized kefir cells as starter culture in hard-type cheese production. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3618-3624, 2009.

LAVARI, L.; IANELLO, R.; PÁEZ, R; ZOTTA, T.; CUATRIN, A.; REINHEIMER, J.;

PARENTE, E.; VINDEROLA, G. Growth of *Lactobacillus rhamnosus* 64 in whey permeate and study of the effect of mild stresses on survival to spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, p. 322-330, 2015.

LAZZI, C.; POVOLO, M.; LOCCI, F.; BERNINI, V.; NEVIANI, E.; GATTI, M. Can the

development and autolysis of lactic acid bacteria influence the cheese volatile fraction?

The case of Grana Padano. **International Journal of Food Microbiology**, v. 233, p. 20-28, 2016.

LIMA, C. P.; BRUNO, L. M.; FIGUEIREDO, E. A. T; QUIBERONI, A. L.; CARVALHO, J. D.

C.; CARVALHO, A. K. F. Phage resistance of acid lactic bacteria isolated from Coalho cheese industries. **Ciência Rural**, v.42, p.1117-1122, 2012.

MADERA, C.; GARCÍA, P.; JANSEN, T.; RODRÍGUEZ, A.; SUÁREZ, J.E. Characterization

of technologically proficient wild *Lactococcus lactis* strains resistant to phage infection.

International Journal of Food Microbiology, v. 86, p. 213-222, 2003.

NIETO-ARRIBAS, P.; POVEDA, J. M.; SESEÑA, S.; PALOP, L. L.; CABEZAS, L.

Technological characterization of *Lactobacillus* isolates from traditional Manchego cheese

for potential use as adjunct starter cultures. **Food Control**, v. 20, p. 1092-1098, 2009.

OTERO, M. C.; ESPECHE, M. C.; NADER-MACÍAS, M. E. Optimization of the freeze-drying media and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* for veterinarian probiotic applications. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1406-1411, 2007.

SABO, S. S.; VITOLO, M.; GONZÁLEZ, J. D. M.; OLIVEIRA, R. P. S. **Food Research International**, v. 64, p.527-536, 2014.

SANTOS, K. M. O.; VIEIRA, A. D. S.; BURITI, F. C. A.; NASCIMENTO, J. C. F.; MELO, M. E. S.; BRUNO, L. M.; BORGES, M. F.; ROCHA, C. R. C.; LOPES, A. C. S.; FRANCO, B. D. G. M.; TODOROV, S. D. Artisanal Coalho cheeses as source of beneficial *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* strains. **Dairy Science and Technology**, v. 95, p. 209-230, 2015.

SVENSSON, U.; CHRISTIANSSON, A. Methods for phage monitoring. Bulletin of the **International Dairy Federation**, v. 263, p. 29-39, 1991.

VINDEROLA, G.; CAPELLINI, B.; VILLAREAL, F.; SUÁREZ, V.; QUIBERONI, A.; REINHEIMER, J. Usefulness of a set of simple in vitro tests for the screening and identification of probiotic strains for dairy use. **LWT Food Science and Technology**, v. 41, p. 1678-1688, 2008.

VINDEROLA, C. G.; COSTA, G. A.; REGENHARDT, S.; REINHEIMER, J. A. Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 579-589, 2002b.

VINDEROLA, C. G.; MOCCHIUTTI, P.; REINHEIMER, J. A. Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 721-729, 2002a.



Agroindústria Tropical



MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**

